

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 mars 2004 (04.03.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/017987 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

A61K 38/16

(74) Mandataire : BOURGOUIN, André; Beaufour Ipsen -
S.C.R.A.S., Direction de la Propriété Industrielle, 24, rue
Erlanger, F-75781 Paris Cedex 16 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/002570

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 25 août 2003 (25.08.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

02/10560

26 août 2002 (26.08.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : SOCI-
ETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'AP-
PLICATIONS SCIENTIFIQUE (S.C.R.A.S.) [FR/FR];
42, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : FERRAN-
DIS, Eric [FR/FR]; 74, avenue Guy de Coubertin, F-78470
Saint Rémy les Chevreuse (FR). TENG, Beng, Poon
[FR/FR]; 6, chemin de la Grange, F-91190 Gif-sur-Yvette
(FR). SOHIER, Christine [FR/FR]; 30, rue des Aubuis,
Les Fourneaux, F-37390 Saint Roch (FR). THURIEAU,
Christophe [FR/FR]; 10, bld Emile Augier, F-75116 Paris
(FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: HETEROCARPIN, A PLANT-DERIVED PROTEIN WITH ANTI-CANCER PROPERTIES

(54) Titre : L'HETEROCARPINE, UNE PROTEINE D'ORIGINE VEGETALE AUX PROPRIETES ANTICANCEREUSES

(57) Abstract: The invention relates to a plant-derived protein with anti-cancer properties which binds the human growth hormone-releasing hormone (hGHRH). Said protein, which is obtained from the *Pilocarpus Heterophyllus* plant, is particularly adapted for preparing a medicament that is intended for the treatment of cancers for which growth is dependant on the GHRH growth factor and, in particular, for preparing a medicament that is intended for the treatment of cancers including small cell lung cancer and breast cancer.

(57) Abrégé : L'invention concerne une protéine d'origine végétale aux propriétés anticancéreuses qui fixe le GHRH humain (*human Growth Hormone releasing hormone* ou hormone libératrice d'hormone de croissance humaine). Cette protéine, obtenue à partir de la plante *Pilocarpus Heterophyllus*, est particulièrement adaptée pour préparer un médicament destiné à traiter les cancers dont la croissance est dépendante du facteur de croissance GHRH, et notamment pour préparer un médicament destiné à traiter un cancer choisi parmi le cancer du poumon à petites cellules et le cancer du sein.

WO 2004/017987 A2

L'hétérocarpine, une protéine d'origine végétale
aux propriétés anticancéreuses

La présente invention concerne une protéine d'origine végétale aux propriétés anticancéreuses qui fixe le GHRH humain (*human Growth Hormone releasing hormone* ou hormone libératrice d'hormone de croissance humaine).

5 L'hormone de croissance (« GH ») est une protéine de 191 acides aminés qui stimule la production de nombreux facteurs de croissance, comme l'*Insulin-Like Growth Factor I* (IGF-1) et déclenche la croissance d'un grand nombre de tissus (squelette, tissus connectifs, muscles et viscères). GH possède également des activités physiologiques en augmentant la synthèse des acides nucléiques, des protéines et de la lipolyse tout en diminuant les sécrétions urinaires (Frohman L.A. & Kineman, R.D., *Handbook of*
10 *Physiology*, Hormonal Control of Growth, édité par Kostyo, J.L. & Goodman, H.M. (Oxford Univ. Press, New York, 1999), p. 189-221).

La synthèse de GH est régulée par des facteurs à action positive ou négative sécrétés par l'hypothalamus. Le facteur majoritaire contrôlant la production de GH est le « Growth Hormone Releasing Hormone » (GHRH), peptide de 44 acides aminés chez l'homme.

15 GH et GHRH sont impliqués dans de nombreuses maladies. Parmi celles-ci, il y a lieu de citer notamment le cancer (en particulier ceux de la prostate ou du poumon), l'acromégalie, les rétinopathies et les néphropathies diabétiques ; pour ces pathologies, un traitement par des antagonistes de GHRH est indiqué. Du fait du nombre de maladies potentiellement concernées, l'industrie continue à chercher des antagonistes de GHRH.

20 La demanderesse vient donc justement d'isoler une nouvelle protéine d'origine végétale, laquelle a pour propriété de fixer le GHRH humain.

L'invention a donc en premier lieu pour objet une protéine isolée susceptible d'être obtenue par extraction de la plante *Pilocarpus heterophyllus*, laquelle est caractérisée en ce qu'elle possède une masse moléculaire d'environ 90,9 kDa et comporte les fragments
25 de séquences peptidiques SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2 et SEQ. ID. NO. 3, ladite protéine étant susceptible de se présenter sous une forme glycosylée ou non glycosylée. Pour simplifier l'exposé qui suit, cette protéine sera désignée ci-après par « hétérocarpine ».

Lesdites séquences SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2 et SEQ. ID. NO. 3 sont les suivantes :

SEQ. ID. NO. 1 : KLIGARYFDK

SEQ. ID. NO. 2 : YGEDIVGVIDSGV

5 SEQ. ID. NO. 3 : PESESY

La nomenclature utilisée ci-dessus (comme dans le reste de la présente demande) pour définir les peptides est celle spécifiée par la «IUPAC-IUB Commissioner on Biochemical Nomenclature» dans laquelle, en accord avec la représentation conventionnelle, l'acide aminé au niveau N-terminal (groupe amino) apparaît à gauche et l'acide aminé au niveau C-terminal (groupe carboxyle) apparaît à droite. Le terme «acide aminé naturel» indique l'un des L-acides aminés naturels trouvés dans les protéines naturelles : Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp et His.

Une protéine est dite « isolée » si elle est prise hors de son environnement original. En particulier, une protéine naturelle est isolée si elle est séparée du matériel biologique avec lequel elle coexiste dans le système naturel.

L'invention concerne de préférence l'hétérocarpine sous sa forme non glycosylée.

Selon une variante préférée de l'invention, l'hétérocarpine est obtenue à partir d'un extrait des cellules de la plante *Pilocarpus Heterophyllus* cultivées *in vitro*.

20 L'invention a par ailleurs également pour objet un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement l'hétérocarpine.

L'hétérocarpine a pour propriété de fixer le GHRH humain. *In vitro*, l'hétérocarpine fixe le GHRH humain et inhibe ainsi la synthèse d'AMP cyclique induite lors de la fixation du GHRH humain sur son récepteur. *In vivo*, chez le rat, le complexe hétérocarpine/GHRH humain se forme dans le compartiment sanguin et inhibe de manière dose-dépendante la synthèse de GH induite par 10 µg de GHRH humain dans un rapport mole à mole. L'hétérocarpine a pour propriété de fixer le GHRH humain.

Ces propriétés rendent les composés de l'invention aptes à une utilisation pharmaceutique. L'invention a donc également pour objet, à titre de médicament, 30 l'hétérocarpine sous une forme glycosylée ou non glycosylée. Elle concerne aussi des compositions pharmaceutiques contenant, à titre de principe actif, l'hétérocarpine sous une forme glycosylée ou non glycosylée, ladite composition comprenant aussi un ou des

excipients pharmaceutiquement acceptables. Elle a de plus pour objet l'utilisation de l'hétérocarpine sous une forme glycosylée ou non glycosylée pour préparer des médicaments destinés à antagoniser les effets de GHRH, à traiter les maladies prolifératives (et notamment le cancer), à traiter l'acromégalie ou à traiter les

5 rétinoopathies et les néphropathies diabétiques. En ce qui concerne le cancer, l'hétérocarpine sera particulièrement adaptée pour préparer un médicament destiné à traiter les tumeurs carcinoïdes et pancréatiques, les gangliocytomes hypothalamo-hypophysaires, les carcinomes bronchiques, intestinaux et hépatiques, les tumeurs sympathoadrénergiques, les phéochromocytomes, les adénomes hypophysaires et les

10 carcinomes thyroïdiens. L'hétérocarpine sera particulièrement adaptée pour préparer un médicament destiné à traiter les cancers dont la croissance est dépendante du facteur de croissance GHRH, et notamment pour préparer un médicament destiné à traiter un cancer choisi parmi le cancer du poumon à petites cellules et le cancer du sein (et tout particulièrement le cancer du poumon à petites cellules).

15 L'invention a encore pour objet, en tant que médicament, un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement l'hétérocarpine. Elle concerne de plus une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, un anticorps monoclonal, ou un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement l'hétérocarpine, ladite composition comprenant aussi un ou des

20 excipients pharmaceutiquement acceptables. Elle concerne en outre l'utilisation d'un anticorps monoclonal, ou d'un fragment de liaison de l'antigène de celui-ci, qui fixe spécifiquement l'hétérocarpine, pour préparer des médicaments destinés à antagoniser les effets de GHRH, à traiter les maladies prolifératives (et notamment le cancer), à traiter l'acromégalie ou à traiter les rétinoopathies et les néphropathies diabétiques. En ce

25 qui concerne le cancer, ledit anticorps monoclonal ou ledit fragment de liaison de l'antigène de celui-ci sera particulièrement adapté pour préparer un médicament destiné à traiter les tumeurs carcinoïdes et pancréatiques, les gangliocytomes hypothalamo-hypophysaires, les carcinomes bronchiques, intestinaux et hépatiques, les tumeurs sympathoadrénergiques, les phéochromocytomes, les adénomes hypophysaires et les

30 carcinomes thyroïdiens.

L'invention concerne encore l'utilisation de l'hétérocarpine comme excipient dans une composition pharmaceutique destinée à la libération prolongée de GHRH. Elle concerne aussi une composition pharmaceutique comprenant GHRH, de l'hétérocarpine et un ou des excipients pharmaceutiquement acceptables.

35 D'autres objets de l'invention sont enfin les procédés permettant d'extraire et d'isoler l'hétérocarpine à partir de cellules de la plante *Pilocarpus Heterophyllus*, lesdites cellules provenant de préférence de cultures *in vitro*. Ces procédés comprennent

essentiellement une étape d'extraction des cellules de la plante *Pilocarpus Heterophyllus* avec de l'eau à une température de 0 à 50 °C, et de préférence de 4 à 25 °C, ladite étape d'extraction étant suivie d'une étape de filtration afin de séparer le filtrat riche en hétérocarpine des cellules de *Pilocarpus Heterophyllus* et d'une ou
5 plusieurs étapes de séparation de l'hétérocarpine des autres composants extraits de la plante *Pilocarpus Heterophyllus*.

Selon une première variante, ces procédés d'extraction et d'isolement comprennent essentiellement les étapes successives suivantes :

- 10 a) une étape d'extraction des cellules de la plante *Pilocarpus Heterophyllus* avec de l'eau à une température de 0 à 50 °C, et de préférence de 4 à 25 °C, ladite étape d'extraction étant suivie d'une étape de filtration afin de séparer le filtrat riche en hétérocarpine des cellules de *Pilocarpus Heterophyllus* ;
- b) une étape de précipitation des protéines extraites, par exemple par addition de sulfate d'ammonium, suivie d'une étape de séparation du précipité (par filtration ou,
15 de préférence, par centrifugation) ;
- c) la mise en solution du précipité récupéré à l'étape b) dans de l'eau ; et
- d) une étape de chromatographie par gel-filtration afin de séparer l'hétérocarpine des autres composants de la solution.

20 Selon une autre variante, ces procédés d'extraction et d'isolement comprennent essentiellement les étapes successives suivantes :

- a) une étape d'extraction des cellules de la plante *Pilocarpus Heterophyllus* avec de l'eau à une température de 0 à 50 °C, et de préférence de 4 à 25 °C, ladite étape d'extraction étant suivie d'une étape de filtration afin de séparer le filtrat riche en hétérocarpine des cellules de *Pilocarpus Heterophyllus* ;
- 25 b) une étape de dégraissage de la solution obtenue en a), acidifiée par ajout d'un acide non oxydant (par exemple de l'acide chlorhydrique, de l'acide sulfurique ou de l'acide phosphorique) à un pH de préférence compris entre 2 et 4, à l'aide d'une extraction liquide-liquide (de préférence en utilisant un solvant organique comme le dichlorométhane, l'heptane, l'hexane ou le cyclohexane) ;
- 30 c) une étape d'élimination des tannins par mise en contact de la solution dégraissée obtenue en c) avec de la polyvinylpyrrolidone (ou encore du nylon 66) suivie d'une filtration sur résine à pores larges (de préférence une telle résine à base de polystyrènes comme la résine Diaion® HP-20) ;

- d) le passage à pH alcalin (de préférence entre pH 9 et 11) du filtrat obtenu après l'étape c) par ajout d'une base comme l'hydroxyde d'ammonium, l'hydroxyde de sodium ou l'hydroxyde de potassium ;
- e) une ou des étapes de filtration sur résine échangeuse d'anions, l'éluant pour cette ou ces étapes de filtration étant de préférence une solution tampon ayant un pH entre 9 et 11 et contenant éventuellement des gradients de concentration en un sel (comme par exemple le chlorure de sodium ou le sulfate d'ammonium), afin de séparer l'hétérocarpine des autres composants de la solution ; et
- f) une étape de dessalage consistant en le passage de la solution obtenue à l'étape e) sur une résine séparant les constituants d'un mélange en fonction de leur masse moléculaire (comme la résine Sephadex® G25 ou Superdex® 200 HR) et l'élution de ce mélange sur ladite résine avec de l'eau.

Les compositions pharmaceutiques contenant un composé de l'invention peuvent être sous forme solide comme, par exemple, les poudres, pilules, granules, comprimés, liposomes, gélules ou suppositoires. Les pilules, les comprimés ou les gélules peuvent être revêtus d'une substance capable de protéger la composition de l'action de l'acide gastrique ou des enzymes dans l'estomac du sujet pendant une période de temps suffisante pour permettre à cette composition de passer non digérée dans l'intestin grêle de ce dernier. Le composé peut aussi être administré localement, par exemple à l'emplacement même d'une tumeur. Le composé peut aussi être administré selon un processus de libération prolongée (par exemple en utilisant une composition à libération prolongée ou une pompe de perfusion). Les supports solides appropriés peuvent être, par exemple, le phosphate de calcium, le stéarate de magnésium, le carbonate de magnésium, le talc, les sucres, le lactose, la dextrine, l'amidon, la gélatine, la cellulose, la cellulose de méthyle, la cellulose carboxyméthyle de sodium, la polyvinylpyrrolidone et la cire.

Les compositions pharmaceutiques contenant un composé de l'invention peuvent également se présenter sous forme liquide comme, par exemple, des solutions, des émulsions, des suspensions ou une formulation à libération prolongée. Les supports liquides appropriés peuvent être, par exemple, l'eau, les solvants organiques tels que le glycérol ou les glycols tel que le polyéthylène glycol, de même que leurs mélanges, dans des proportions variées, dans l'eau.

L'administration d'un médicament selon l'invention pourra se faire par voie topique, orale, parentérale, par injection intramusculaire, etc.

La dose d'un composé selon la présente invention, à prévoir pour le traitement des maladies ou troubles mentionnés ci-dessus, varie suivant le mode d'administration, l'âge et le poids corporel du sujet à traiter ainsi que l'état de ce dernier, et il en sera décidé en définitive par le médecin ou le vétérinaire traitant. Une telle quantité déterminée par le
5 médecin ou le vétérinaire traitant est appelée ici "quantité thérapeutiquement efficace".

Conformément à l'invention, on peut préparer l'hétérocarpine par le procédé décrit ci-après.

Préparation de l'hétérocarpine

Selon une variante préférée de l'invention, des cultures *in vitro* de cals ou de
10 suspensions cellulaires issus de différents organes de la plante ont été effectuées. Ces tissus cultivés sur milieu semi-solide ou liquide sont capables de bio-synthétiser des composés ayant des propriétés biologiques.

Par « cal », il faut entendre dans la présente demande un amas macroscopique de cellules indifférenciées de plantes en culture sur un milieu nutritif semi-solide. Par
15 « cellules indifférenciées » sont désignées dans la présente demande des cellules qui ont une aptitude sous certaines conditions à se multiplier sous forme d'un cal ou d'une suspension cellulaire sans phénomène de morphogenèse. Enfin, par « suspension cellulaire », on entend des cellules indifférenciées pouvant former des amas microscopiques en culture dans un milieu de nutrition liquide.

20 Le choix du milieu nutritif, des hormones, des conditions de culture font partie intégrante de l'invention ainsi que l'extraction et l'analyse de l'extrait à partir de ces cultures *in vitro*.

Les cellules de graines de *Pilocarpus Heterophyllus* peuvent être cultivées en suspension par exemple selon la procédure ci-après.

25 Les organes sont décontaminés selon les méthodes habituelles avant la mise en culture. Des organes de plantules *in vitro* ont également servi de matériel de départ à la callogénèse sans nécessiter de désinfection préalable. Le milieu nutritif de base préféré est l'un des milieux couramment utilisés pour la culture *in vitro* : il s'agit du milieu de Gamborg (décrit dans Gamborg et coll., Nutrient requirements of suspension cultures of
30 Soybean root cells, *Exp. Cell Res.* (1968), 50(1), 151-158). La source de carbone est le saccharose mais le glucose peut également être employé à une concentration de 1 à 120 g/l, de préférence de 30 g/l environ. On peut également diminuer la teneur en

macro-éléments par un facteur 2. Le milieu est additionné d'auxine ou d'une auxine et d'une cytokinine avec une préférence pour l'association des 2 hormones, en général l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et la kinétine, mais l'acide α -naphthalèneacétique (ANA), l'acide β -indoleacétique (AIA), l'acide β -indolbutanoïque (AIB) ou le picloram peuvent aussi être combinés à la kinétine ou à la benzylaminopurine (BAP). La concentration peut varier de 0,1 à 10 mg/l pour l'auxine (on pourra choisir par exemple 1 mg/l), et de 0,01 à 2 mg/l pour la cytokinine (on pourra choisir par exemple 0,06 mg/l). Les vitamines sont celles associées aux différents milieux de base. Les cultures sont faites à la lumière ou à l'obscurité. La température peut varier de 10 °C à 33 °C mais sera préférentiellement d'environ 23 °C. Le pH du milieu est compris entre 4 et 6,5 et préférentiellement ajusté à 5,8 avant stérilisation. Le milieu peut par ailleurs être additionné ou non d'agar.

Les cals primaires apparaissent après quelques jours de culture et peuvent être séparés de l'implant d'origine, prélevés et repiqués après environ 1 mois puis cultivés sur milieu semi-solide gélosé (en tube ou en boîte de Pétri), avec des passages de 4 à 8 semaines, de préférence 6 semaines, on peut ainsi conserver un cal pendant des années par repiquages successifs sur des milieux neufs. On peut également repiquer le cal dans un milieu de culture liquide agité (fiole erlenmeyer ou bioréacteur) avec des repiquages de 2 à 6 semaines de préférence 3 semaines.

Les souches obtenues se distinguent par l'origine génétique, les conditions de culture, l'aspect et l'absence de morphogénèse.

Les cellules de *Pilocarpus Heterophyllus* lyophilisées sont extraites avec de l'eau à une température de 0 à 50 °C, et de préférence de 4 à 25 °C. L'extrait ainsi obtenu est lyophilisé avant d'être redissous à une concentration adéquate (par exemple environ 30 % de matière sèche). Les protéines précipitées par ajout d'une solution concentrée de sulfate d'ammonium (par exemple à une concentration représentant de 70 à 90 % de la concentration de saturation) sont dissoutes dans un minimum d'eau et les matières insolubles sont récupérées par centrifugation. Les protéines sont ensuite séparées par chromatographie sur colonne (l'éluant étant de préférence de l'eau) et l'hétérocarpine (identifiable par sa masse moléculaire d'environ 90,9 kDa) peut alors être récupérée.

Préparation d'anticorps fixant spécifiquement l'hétérocarpine

La présente invention fournit des agents de fixation, comme les anticorps qui fixent spécifiquement l'hétérocarpine. Un tel agent est dit comme « fixant spécifiquement »

une protéine s'il réagit à un niveau détectable (par exemple par un essai ELISA) avec ladite protéine et ne réagit pas de manière détectable avec d'autres protéines. « La fixation » se réfère à une association non covalente entre 2 molécules séparées de telle sorte qu'un complexe se forme. La capacité à la fixation peut être évaluée, par exemple, par la détermination de la constante de fixation pour la formation du complexe. La constante de fixation est la valeur obtenue lorsque la valeur de la concentration du complexe est divisée par le produit des valeurs des concentration des composants non complexés. 2 produits seront dits « fixés » lorsque la constante de fixation atteint 103 l/mol. La constante de fixation peut être déterminée en utilisant des méthodes bien connues de l'homme du métier.

N'importe quel agent capable de répondre aux critères ci-dessus peut être considéré comme un agent fixant.

Dans la présente invention, un agent de fixation est de préférence un anticorps ou un fragment de celui-ci. Les anticorps peuvent être préparés par n'importe quelle technique disponible à l'homme du métier (cf. Harlow et Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). En général, les anticorps peuvent être produits par des techniques de culture cellulaire incluant la génération d'anticorps monoclonaux ou *via* des transfections de gènes d'anticorps dans des cellules hôtes de bactéries ou de mammifères afin de produire les anticorps recombinants.

Parmi d'autres techniques, on préférera employer celles décrites ci-après. Un immunogène contenant l'hétérocarpine est injecté chez un groupe de mammifères (par exemple des souris, rats, lapins, moutons ou chèvres). Dans cette étape, l'hétérocarpine peut servir d'immunogène sans modification. Alternativement, une réponse immunitaire supérieure peut être induite si l'hétérocarpine est jointe à une protéine de transport comme l'albumine de sérum bovin ou l'hémocyanine de patelle. L'immunogène est injecté chez l'animal hôte, de préférence selon un schéma prédéterminé, et les animaux sont saignés périodiquement. Des anticorps poly-clonaux spécifiques de l'hétérocarpine peuvent ainsi être purifiés à partir de tels antisérum, par exemple, par chromatographie d'affinité en utilisant de l'hétérocarpine couplée à un support solide adéquat.

30 Compositions pharmaceutiques destinées à la libération de GHRH :

Ces compositions peuvent notamment être préparées à partir de l'hétérocarpine et de GHRH selon l'une des méthodes décrites dans la revue de De Wolf et Brett, *Pharmacological Reviews* (2000), 52, 207-236 et les références qui y sont citées.

A moins qu'ils ne soient définis d'une autre manière, tous les termes techniques et scientifiques utilisés ici ont la même signification que celle couramment comprise par un spécialiste ordinaire du domaine auquel appartient cette invention. De même, toutes les publications, demandes de brevets, tous les brevets et toutes autres références
5 mentionnées ici sont incorporées par référence.

Les exemples suivants sont présentés pour illustrer les procédures ci-dessus et ne doivent en aucun cas être considérés comme une limite à la portée de l'invention.

OBTENTION DE L'HETEROCARPINE

Exemple 1 :

10 *Culture de cellules in vitro :*

Une graine de *Pilocarpus Heterophyllus* est mise à germer et la tige issue de cette germination est prélevée. Ladite tige est mise en culture dans un milieu de Gamborg (Gamborg et coll., Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells, *Exp. Cell Res.* (1968), 50(1), 151-158) additionné de 30 g/l de saccharose, de 1 mg/l
15 d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et de 0,06 mg/l de kinétine. La culture est effectuée dans des tubes à une température de 23° C et dans l'obscurité. Des repiquages sont effectués toutes les 6 semaines dans des conditions habituelles. Les souches, d'aspect granuleux, possèdent une pigmentation beige.

Une cinétique de croissance des souches, basée sur l'augmentation de masse de matière
20 fraîche et sèche de la biomasse, a été réalisée sur 8 semaines. Les cals de 2 tubes sont réunis et constituent une récolte bihebdomadaire, la première récolte ayant lieu au temps 0. Cals et gélose sont ensuite récoltés et lyophilisés. On constate que la croissance est exponentielle jusqu'à 6 semaines de culture avant l'apparition d'une phase stationnaire de croissance.

25 *Extraction des cultures cellulaires :*

25 g de cellules de *Pilocarpus Heterophyllus* lyophilisées sont extraites 2 fois par immersion dans 375 ml d'eau à 4° C, et laissées la nuit à 4° C, puis dans 250 ml d'eau à 4° C pendant 4 heures et finalement lavées avec 125 ml d'eau à 4° C. Chaque solution aqueuse ainsi obtenue est filtrée sous vide au travers d'un filtre de verre surmonté de

- célite pour séparer les débris cellulaires de la solution aqueuse. Les solutions aqueuses ainsi combinées sont ensuite lyophilisées pour obtenir 9,4 g de matière sèche. L'extrait sec lyophilisé est ensuite dissous dans 31 ml d'eau à 20° C pour obtenir une solution contenant 30 % d'extrait sec. 17,4 g de sulfate d'ammonium sont ajoutés par petites portions avec une agitation magnétique constante pour précipiter la fraction protéique. Le précipité protéique est ensuite séparé de la solution de sulfate d'ammonium par centrifugation à 3000 rpm pendant 20 minutes. La solution de sulfate d'ammonium est décantée et les protéines précipitées sont dissoutes dans 22 ml d'eau, re-centrifugées et filtrées pour éliminer les particules insolubles.
- Le filtrat obtenu est ensuite soumis à une chromatographie par gel-filtration. Il est injecté dans une colonne (Buchi N° 19678, L = 230 mm ; diamètre interne = 26 mm) remplie de Superdex™ 200 (Amersham Pharmacia Biotech, référence n° 17-1043-01 ; particules de diamètre moyen de 13 µm) préparée selon les recommandations du fabricant en utilisant de l'eau ultra-pure (Water's Milli-Q) comme éluant à un débit de 5 ml par minute. Des fractions de 40 ml sont ainsi collectées et la protéine active est trouvée dans la troisième et la quatrième fraction. Ces fractions sont lyophilisées pour obtenir environ 14,2 mg de produit actif.
- La pureté du produit obtenu est démontrée par l'apparition d'une seule bande sur gel d'électrophorèse contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS PAGE). Le produit correspondant à cette bande est désigné dans ce qui suit comme l'hétérocarpine.

Exemple 2 :

- Les cellules cultivées *in vitro* selon la même procédure que celle décrite dans l'exemple 1 ci-dessus sont extraites selon la méthode décrite ci-après.
- 100 g de cellules de *Pilocarpus Heterophyllus* lyophilisées sont extraites à l'aide de 2 litres d'eau déminéralisée à 20 °C, le mélange étant maintenu agité pendant une nuit. Les cellules et l'extrait sont filtrés par succion sur fritté (porosité 3, diamètre de 20 cm) recouvert d'un lit de célite (préalablement lavée avec de l'acide ; 1 à 2 cm d'épaisseur). Les cellules récupérées sont lavées avec 400 ml d'eau déminéralisée avant d'être éliminées. Le filtrat aqueux est ensuite acidifié à pH 3,0 par addition d'environ 10 ml d'acide chlorhydrique à 18%. La solution acidifiée est ensuite dégraissée par extraction liquide-liquide à l'aide de 400 ml de dichlorométhane. La phase dichlorométhane est décantée puis éliminée. La solution dégraissée est soumise à une évaporation rotative pour éliminer le dichlorométhane résiduel. Environ 30 g de polyvinylpyrrolidone sont ensuite ajoutés à la solution dégraissée (pH environ 3,0) et le mélange est agité pendant environ 30 minutes pour éliminer les tannins. Le mélange est filtré un lit par succion sur fritté (porosité 3, diamètre de 10 cm) recouvert d'un lit mixte composé de 25 g de célite (préalablement lavée avec de l'acide) et 25 g de polyvinylpyrrolidone. Le filtrat est

ensuite passé à travers un lit de 400 ml de Diaion[®] HP-20 (Mitsubishi Chemical Company) pré-activé selon les instructions du fabricant. Le filtrat résultant est ensuite rendu alcalin (pH 10) par addition d'environ 60 ml d'une solution d'hydroxyde d'ammonium à 20%. Une légère précipitation apparaît après 30 minutes de repos. 1 g de

5 célite (préalablement lavée avec de l'acide) est ajouté à la solution alcaline qui est ensuite filtrée par succion à travers un filtre à membrane (0,22 µm). Environ 2 litres de filtrat sont ensuite passés à travers une colonne HiPrep[®] Q XL 16/10, montée sur un purificateur Akta[®] et pré-équilibrée à pH 10,2 avec un tampon pipérazine/HCl 0,1M, avec un débit de 0,5 ml par minute (la colonne HiPrep[®] et le purificateur Akta[®] sont

10 tous deux des produits de la société Amersham Biosciences). La colonne est ensuite successivement lavée avec 6 volumes de colonne du tampon de départ à pH 10,2, 5 volumes de colonne du même tampon contenant une concentration 0,2M de NaCl; et 10 volumes de colonne du même tampon contenant une concentration 1M de NaCl. La majorité de l'hétérocarpine est récupérée dans les trois premiers 3 volumes de colonne

15 de tampon contenant la concentration 1M de NaCl. Les fractions actives sont dessalées par passage à travers une colonne Sephadex[®] G25 (volume du lit : 260 ml) en utilisant de l'eau déminéralisée comme éluant. Les fractions actives, trouvées dans le premier volume de colonne correspondant au volume mort, sont ensuite lyophilisées pour obtenir 170 mg d'hétérocarpine. L'hétérocarpine ainsi obtenue est pratiquement mono-

20 bande sur gel SDS PAGE.

CARACTERISATION DE L'HETEROCARPINE

Analyse et micro-séquençage :

Les échantillons sont chargés sur un gel de polyacrylamide à 10 %. Après migration, les gels sont fixés et colorés au bleu de Coomassie.

25 Les pistes du gel représenté dans la **Figure 3** correspondant aux pistes 1, 2, 3, 4 et 5 sont respectivement le marqueur de poids moléculaire (Amersham), 0,5, 1 et 2 µg du contenu de la fraction finale d'hétérocarpine telle qu'obtenue à l'exemple 1 et le

30 marqueur de masse moléculaire (Amersham). La détermination de la masse moléculaire grâce à une courbe standard du marqueur de masse moléculaire en utilisant des outils informatiques classiques et bien connus de l'homme de l'art (par exemple, le logiciel Bio-Profil Bio1D de Viber Lourmat) permet de montrer que l'hétérocarpine possède une masse moléculaire de 90,9 kiloDaltons (± 1,6 kiloDaltons).

Pour l'analyse par micro-séquençage de protéine, la bande de polyacrylamide contenant la protéine est découpée et digérée dans 300 µl de tampon de digestion contenant 50 mM Tris (pH 8,6), 0,03 % de dodécylsulfate de sodium à 35° C pendant 18 heures en présence de 0,4 µg d'endolysine-C (Sigma). Les peptides obtenus sont séparés, par
5 HPLC, sur colonne en ligne de DEAE-C18 de 1 mm de diamètre. Le gradient de séparation est basé sur un mélange d'acétonitrile (de 2 à 70 %) et d'acide trifluoroacétique à 0,1 % (TFA). Le séquençage est ensuite réalisé sur un séquenceur Procise (Applied Biosystem). Trois pics ont ainsi été séquencés, permettant de caractériser de manière unique l'hétérocarpine. Les séquences correspondantes sont
10 identifiées dans la présente demande par SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2 et SEQ. ID. NO. 3.

L'analyse des glycoprotéines est réalisée par la détection de structures sucrées des glycoprotéines séparées par gel SDS-PAGE. Ce système de détection est une modification des méthodes « Periodic acid-Schiff » et conduit à l'apparition de bandes
15 magenta mettant en évidence les glycoprotéines (Sigma). On obtient, pour l'hétérocarpine telle qu'obtenue à l'exemple 1, le résultat reproduit en Figure 4.

PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DE L'HETEROCARPINE

Transfections stables du récepteur humain à GHRH (hGHRH-R) :

Les cellules humaines embryonnaires de reins, HEK-293, (une lignée cellulaire
20 développée par le Dr. Stuart Sealfon, Mount Sinai Medical School, New York, New York) exprimant de manière stable le récepteur humain à GHRH ont été obtenues du Dr. Kelly Mayo (Northwestern University, Chicago, IL).

Culture cellulaire et préparation membranaire :

Les cellules HEK-293 transfectées de manière stable avec le récepteur humain à GHRH
25 décrites ci-dessus sont cultivées en DMEM (milieu de Eagle modifié par Dulbecco, forte teneur en glucose ; fourni par Life technologies) supplémenté avec 0,4 mg/ml de G418 (Life technologies) en présence de 10 % de sérum de veau fœtal et de 4 mM de L-glutamine (Life technologies). Les cellules sont homogénéisées dans le tampon A contenant 50 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂), 2 mM
30 d'acide éthylèneglycol-bis(2-amino-éthyl)-N,N,N',N'-tétraacétique (EGTA) et 50 µg/ml de bacitracine puis sont soumises à sonication dans le même tampon A. Les cellules ainsi homogénéisées sont centrifugées à 4° C à 39 000 g pendant 10 minutes, suspendues dans le tampon A et re-centrifugées à 4° C à 40 000 g pendant 10 minutes.

Les protéines totales membranaires sont quantifiées par la technique de Bradford. Les membranes culottées sont ainsi stockées à -80°C pour une utilisation ultérieure.

Test de liaison compétitive sur hGHRH-R :

Les membranes des cellules HEK-293 transfectées de manière stable avec le récepteur
5 humain à GHRH sont diluées à la concentration de $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ dans le tampon
réactionnel contenant 50 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM de MgCl_2 , 2 mM d'EGTA,
 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ de bacitracine et $0,5\%$ d'albumine de sérum bovin (BSA). Les membranes
sont incubées avec $0,05\text{ nM}$ de $[^{125}\text{I}]\text{GHRH}(1-44\text{ amide})$ (Amersham) dans un volume
final de $200\text{ }\mu\text{l}$ en présence de concentrations croissantes d'hétérocarpine pendant
10 2 heures à 23°C . La réaction est arrêtée par une filtration rapide sur des filtres 96 puits
GF/C pré-chargés à $0,1\%$ en polyéthylèneimine. Les filtres sont ensuite lavés trois fois à
 4°C avec du tampon de lavage contenant 50 mM Tris (pH 7,4) en utilisant une station
de filtration Packard 96 puits. Les filtres ainsi séchés sont submergés de $20\text{ }\mu\text{l}$ de
cocktail scintillant (Microscint O, Packard) et sont soumis à un comptage sur le
15 Topcount (Packard). L'activité non-spécifique est déterminée en présence de 100 nM de
hGHRH. Une courbe dose-réponse est générée pour hGHRH ($0,001\text{ nM}$ - 100 nM) et les
résultats obtenus sont repris en **Figure 1**.

Formation compétitive d'AMP cyclique :

Les cellules HEK-293 transfectées de manière stable avec le récepteur humain à GHRH
20 sont distribuées dans des plaques de culture 48 puits et cultivées pendant 3 jours. Le
milieu de culture est ensuite retiré et remplacé par le milieu B contenant $250\text{ }\mu\text{l}$ de
DMEM (milieu de Eagle modifié par Dulbecco, forte teneur en glucose ; fourni par Life
technologies) en présence de $0,5\%$ de BSA, $0,5\text{ mM}$ de 3-isobutyl-1-méthylxanthine
(IBMX) et pré-incubées 5 minutes à 37°C . A la fin de la période de pré-incubation,
25 l'hétérocarpine est testée pendant 20 minutes additionnelles. Les concentrations
observées sont reportées en **Figure 2**. L'incubation est stoppée par l'ajout de $100\text{ }\mu\text{l}$ de
 $\text{HCl } 0,1\text{M}$ et les aliquots sont analysés pour leur contenu en AMP cyclique en utilisant
le kit FlashPlate (New England Nuclear).

Dosage de GH chez les rats :

30 Les niveaux de GH chez les rats (mâles, Sprague Dawley) sont mesurés dans des
prélèvements sanguins par un test enzymo-immunologique développé par Spi-Bio (Spi-
Bio, France). Les rats sont traités par injection intra-veineuse d'hétérocarpine à des
doses croissantes (véhicule seul, 1 , 3 et 10 nmol), puis, 10 minutes après, par injection
intra-veineuse de $10\text{ }\mu\text{g}$ (3 nmol) de hGHRH. Dix minutes après l'injection du hGHRH,

les niveaux de l'hormone de croissance sont mesurés dans les prélèvements sanguins comme décrit ci-dessus. Les résultats obtenus sont représentés en **Figure 5**.

Mesure de l'activité anti-tumorale :

- Les cellules tumorales humaines et en particulier les cellules de cancer du poumon à petites cellules H-69 sont injectées sous la peau de souris athymiques afin de produire une xénogreffe de tumeur humaine d'environ 80 mm³ une dizaine de jours après la première greffe. Les souris sont traitées tous les deux jours par injection intra-veineuse d'hétérocarpine à des doses croissantes (véhicule seul, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg et 10 mg/kg). Le volume des tumeurs est ensuite mesuré tous les 4 jours pendant toute la durée du traitement.

Brève description des figures :

La **Figure 1** est une courbe représentant l'inhibition de fixation du GHRH humain sur le récepteur à GHRH humain en fonction de concentrations croissantes d'hétérocarpine.

- La **Figure 2** est une courbe représentant l'inhibition de production d'AMP cyclique dans des cellules transfectées de manière stable avec le récepteur à GHRH humain en présence de 10 nM de GHRH humain en fonction de concentrations croissantes d'hétérocarpine.

La **Figure 3** est la reproduction d'une plaque de gel de protéine SDS-PAGE montrant la présence de l'hétérocarpine ayant un poids moléculaire de 90,9 kDa.

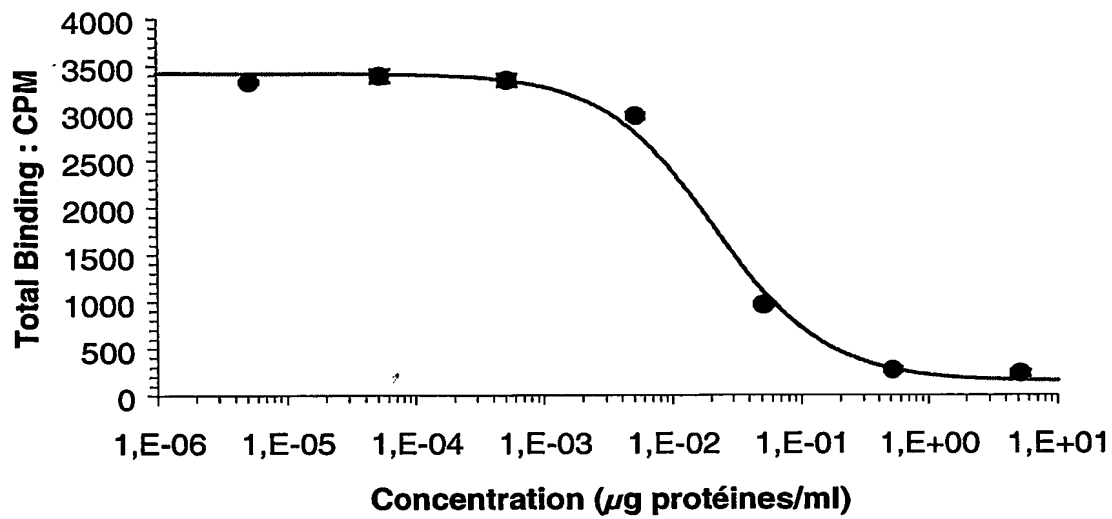
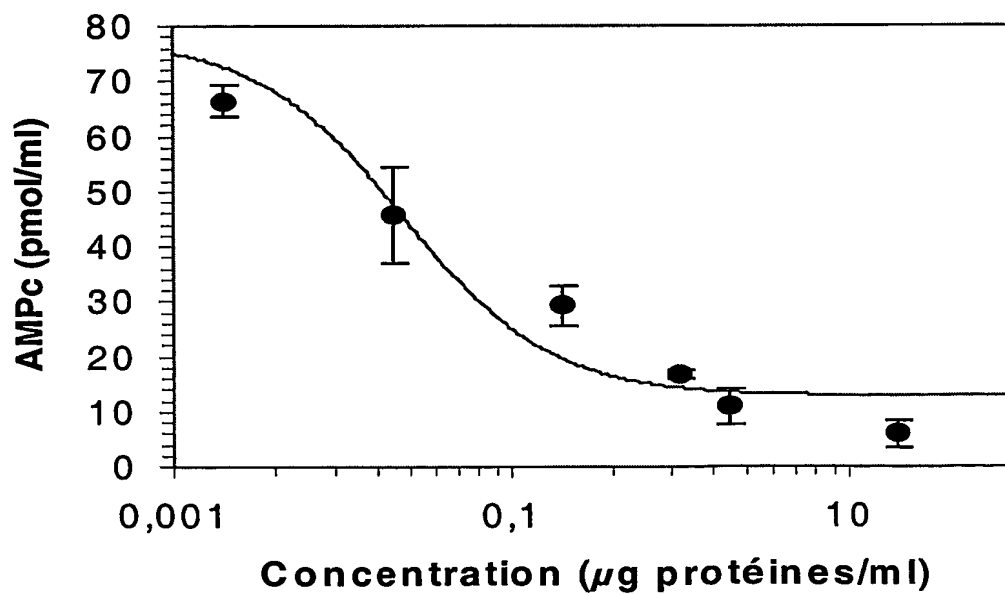
- La **Figure 4** est la reproduction d'une plaque de gel de protéine SDS-PAGE montrant que l'hétérocarpine est une glycoprotéine (Panneau B).

La **Figure 5** est une représentation sous forme d'histogrammes représentant l'inhibition de synthèse de GH chez le rat en présence de 10 µg de GHRH humain en fonction de concentrations croissantes d'hétérocarpine.

Revendications

1. Utilisation d'une protéine isolée susceptible d'être obtenue par extraction de la plante *Pilocarpus heterophyllus*, ladite protéine étant caractérisée en ce qu'elle possède une masse moléculaire d'environ 90,9 kDa et comporte les fragments de séquences peptidiques SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2 et SEQ. ID. NO. 3, cette protéine étant en outre susceptible de se présenter sous une forme glycosylée ou non glycosylée, pour préparer un médicament destiné à traiter les cancers dont la croissance est dépendante du facteur de croissance GHRH.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la protéine a été obtenue à partir d'un extrait des cellules de la plante *Pilocarpus Heterophyllus* cultivées *in vitro*.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les cancers dont la croissance est dépendante du facteur de croissance GHRH sont choisis parmi le cancer du poulmon à petites cellules et le cancer du sein.
4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le cancer dont la croissance est dépendante du facteur de croissance GHRH est le cancer du poulmon à petites cellules.
5. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le cancer dont la croissance est dépendante du facteur de croissance GHRH est le cancer du sein.

PL. 1/4

**Figure 1****Figure 2**

PL. 2/4

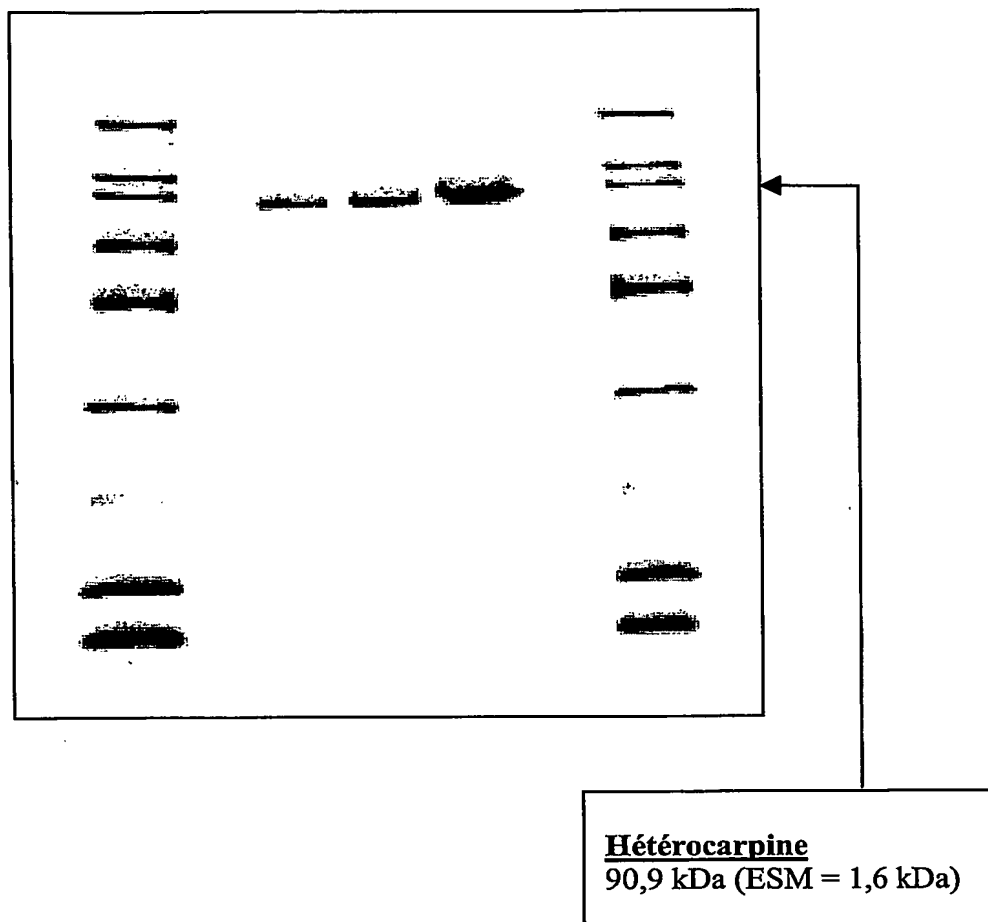
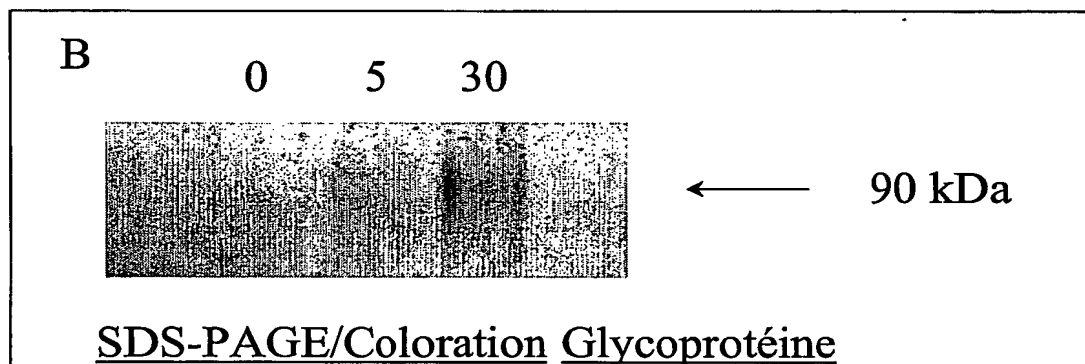
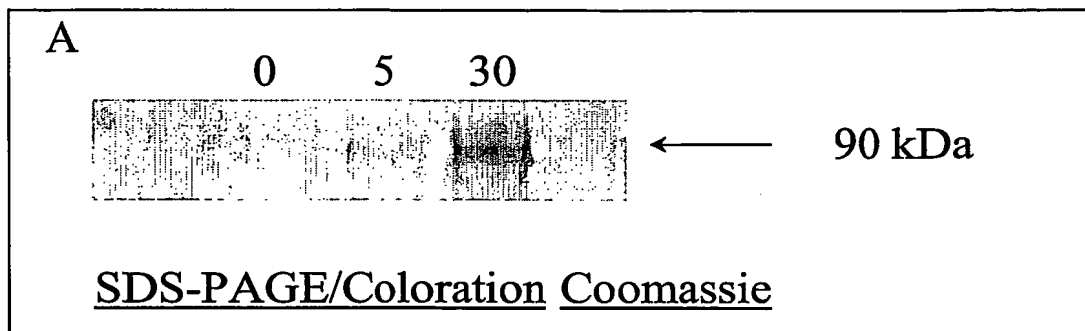
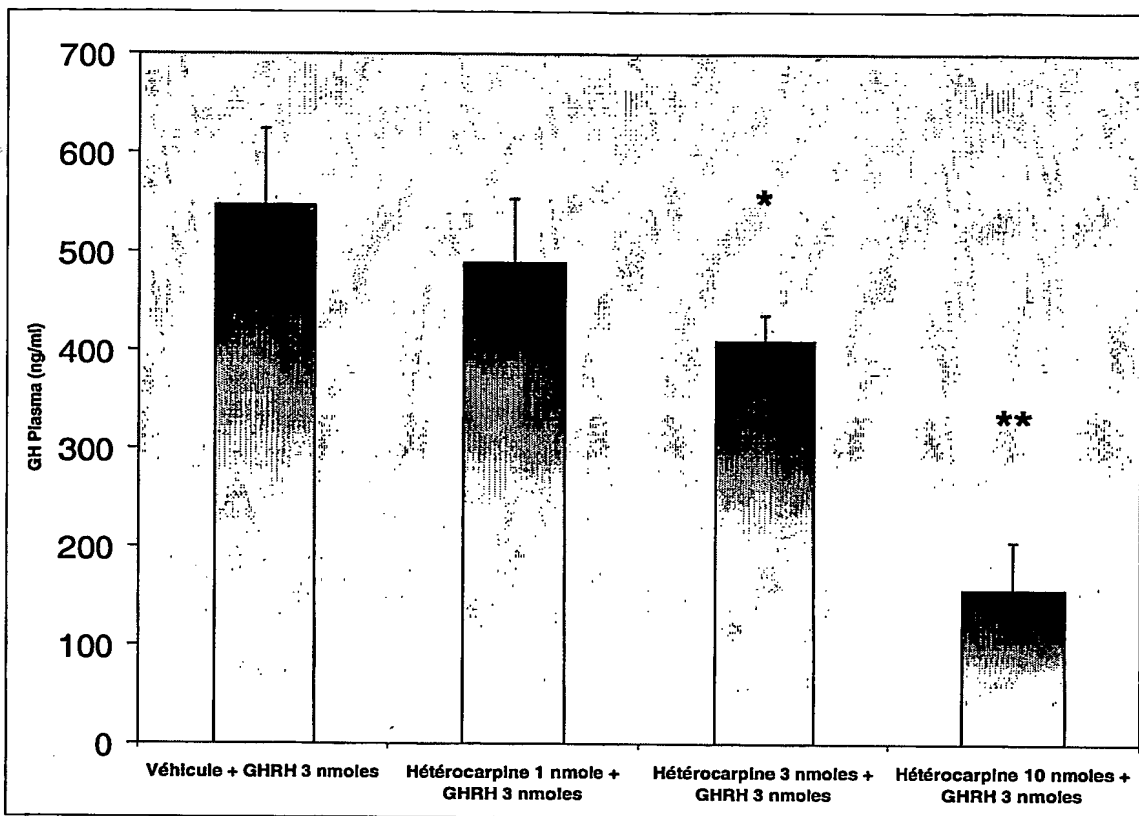


Figure 3

PL. 3/4

**Figure 4**

PL. 4/4

**Figure 5**

LISTE DE SEQUENCES

<110> Société de Conseils de Recherches et d'Application

<120> L'hétérocarpine, une protéine d'origine végétale aux propriétés anticancéreuses

<130> RS 329 FR - Liste séquences

<140> FR 02/15560

<141> 2002-08-26

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus

<400> 1

Lys Leu Ile Gly Ala Arg Tyr Phe Asp Lys
1 5 10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus

<400> 2

Tyr Gly Glu Asp Ile Ile Val Gly Val Ile Asp Ser Gly Val
1 5 10

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus

<400> 3

Pro Glu Ser Glu Ser Tyr
1 5

SEQUENCE LISTING

<110> Société de Conseils de Recherches et d'Application

<120> Heterocarpine, a protein of vegetable origin with anticancer properties

<130> RS 329 FR - Liste séquences

<140> FR 02/15560

<141> 2002-08-26

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus

<400> 1

Lys Leu Ile Gly Ala Arg Tyr Phe Asp Lys
 1 5 10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus

<400> 2

Tyr Gly Glu Asp Ile Ile Val Gly Val Ile Asp Ser Gly Val
 1 5 10

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Pilocarpus Heterophyllus

<400> 3

Pro Glu Ser Glu Ser Tyr
 1 5

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 mars 2004 (04.03.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/017987 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 35/78, 38/16, A61P 35/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002570

(22) Date de dépôt international : 25 août 2003 (25.08.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/10560 26 août 2002 (26.08.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : SOCI-
ETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'AP-
PLICATIONS SCIENTIFIQUE (S.C.R.A.S.) [FR/FR];
42, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : FERRAN-
DIS, Eric [FR/FR]; 74, avenue Guy de Coubertin, F-78470
Saint Rémy les Chevreuse (FR). TENG, Beng, Poon
[FR/FR]; 6, chemin de la Grange, F-91190 Gif-sur-Yvette
(FR). SOHIER, Christine [FR/FR]; 30, rue des Aubuis,
Les Fourneaux, F-37390 Saint Roch (FR). THURIEAU,
Christophe [FR/FR]; 10, bld Emile Augier, F-75116 Paris
(FR).

(74) Mandataire : BOURGOUIN, André; Beaufour Ipsen -
S.C.R.A.S., Direction de la Propriété Industrielle, 24, rue
Erlanger, F-75781 Paris Cedex 16 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 22 avril 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: HETEROCARPIN, A PLANT-DERIVED PROTEIN WITH ANTI-CANCER PROPERTIES

(54) Titre : L'HETEROCARPINE, UNE PROTEINE D'ORIGINE VEGETALE AUX PROPRIETES ANTICANCEREUSES

(57) Abstract: The invention relates to a plant-derived protein with anti-cancer properties which binds the human growth hormone-releasing hormone (hGHRH). Said protein, which is obtained from the *Pilocarpus Heterophyllus* plant, is particularly adapted for preparing a medicament that is intended for the treatment of cancers for which growth is dependant on the GHRH growth factor and, in particular, for preparing a medicament that is intended for the treatment of cancers including small cell lung cancer and breast cancer.

(57) Abrégé : L'invention concerne une protéine d'origine végétale aux propriétés anticancéreuses qui fixe le GHRH humain (*human Growth Hormone releasing hormone* ou hormone libératrice d'hormone de croissance humaine). Cette protéine, obtenue à partir de la plante *Pilocarpus Heterophyllus*, est particulièrement adaptée pour préparer un médicament destiné à traiter les cancers dont la croissance est dépendante du facteur de croissance GHRH, et notamment pour préparer un médicament destiné à traiter un cancer choisi parmi le cancer du poulmon à petites cellules et le cancer du sein.

WO 2004/017987 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/02570

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/78 A61K38/16 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 02 068461 A (THURIEAU CHRISTOPHE ;FERRANDIS ERIC (FR); TENG BENG POON (FR); SOD) 6 September 2002 (2002-09-06) * voir revendications et page 2 lignes 1-26 *	1,2
A	WO 95 16707 A (SCHALLY ANDREW VICTOR ;UNIV TULANE (US); ZARANDI MARTA (US)) 22 June 1995 (1995-06-22) * voir revendications * --- -/-	1-5



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 February 2004

Date of mailing of the international search report

10/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Merckling-Ruiz, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR93/02570

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p> JAFFE C A ET AL: "Suppression of growth hormone (GH) hypersecretion due to ectopic GH-releasing hormone (GHRH) by a selective GHRH antagonist" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, NEW YORK, NY, US, vol. 82, no. 2, 1997, pages 634-637, XP002182305 ISSN: 0021-972X * voir abrégé * </p>	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 03/02570

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
SEE SUPPLEMENTARY SHEET PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.2

The concept of "cancers, the growth of which is dependent on the growth factor GHRH" is not clearly defined for a person skilled in the art. The search has been restricted to the cancers cited in claims 3-5 and on page 3, lines 5-14 of the application. A complete search has therefore not been carried out for claims 1 and 2.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority, the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report or in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/02570

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02068461	A	06-09-2002	FR 2821359 A1	30-08-2002
			CA 2437516 A1	06-09-2002
			WO 02068461 A2	06-09-2002
			HU 0303244 A2	29-12-2003
WO 9516707	A	22-06-1995	US 5550212 A	27-08-1996
			AU 695315 B2	13-08-1998
			AU 1332295 A	03-07-1995
			CA 2178218 A1	22-06-1995
			DE 69426270 D1	14-12-2000
			DE 69426270 T2	05-07-2001
			DK 734396 T3	12-02-2001
			EP 0734396 A1	02-10-1996
			ES 2152380 T3	01-02-2001
			GR 3035170 T3	30-04-2001
			JP 9506616 T	30-06-1997
			NZ 277926 A	19-12-1997
			PT 734396 T	30-04-2001
			WO 9516707 A1	22-06-1995
			ZA 9409641 A	25-08-1995

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 02/02570

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K35/78 A61K38/16 A61P35/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
E	WO 02 068461 A (THURIEAU CHRISTOPHE ; FERRANDIS ERIC (FR); TENG BENG POON (FR); SOD) 6 septembre 2002 (2002-09-06) * voir revendications et page 2 lignes 1-26 *	1,2
A	WO 95 16707 A (SCHALLY ANDREW VICTOR ; UNIV TULANE (US); ZARANDI MARTA (US)) 22 juin 1995 (1995-06-22) * voir revendications *	1-5
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
26 février 2004		10/03/2004
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Merckling-Ruiz, V

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/F/02570

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>JAFFE C A ET AL: "Suppression of growth hormone (GH) hypersecretion due to ectopic GH-releasing hormone (GHRH) by a selective GHRH antagonist"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, NEW YORK, NY, US, vol. 82, no. 2, 1997, pages 634-637, XP002182305</p> <p>ISSN: 0021-972X</p> <p>* voir abrégé *</p> <p>-----</p>	1-5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. de internationale n°
PCT/FR 03/02570

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} — se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n^{os} — se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os} —
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os} —

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

Suite du cadre I.2

Le concept de "cancers dont la croissance est dépendante du facteur de croissance GHRH" n'est pas clairement défini pour l'homme du métier. La recherche a été limitée aux cancers cités dans les revendications 3-5 et à la page 3 lignes 5-14 de la demande. Les revendications 1 et 2 ont donc été Recherchées de manière incomplète.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR/02570

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02068461 A	06-09-2002	FR 2821359 A1	30-08-2002
		CA 2437516 A1	06-09-2002
		WO 02068461 A2	06-09-2002
		HU 0303244 A2	29-12-2003
WO 9516707 A	22-06-1995	US 5550212 A	27-08-1996
		AU 695315 B2	13-08-1998
		AU 1332295 A	03-07-1995
		CA 2178218 A1	22-06-1995
		DE 69426270 D1	14-12-2000
		DE 69426270 T2	05-07-2001
		DK 734396 T3	12-02-2001
		EP 0734396 A1	02-10-1996
		ES 2152380 T3	01-02-2001
		GR 3035170 T3	30-04-2001
		JP 9506616 T	30-06-1997
		NZ 277926 A	19-12-1997
		PT 734396 T	30-04-2001
		WO 9516707 A1	22-06-1995
		ZA 9409641 A	25-08-1995